

CIRAD
ATP 96/21

SÉMINAIRE GESTION RAISONNÉE DES RÉSISTANCES
DES PLANTES AUX PATHOGÈNES

MONTPELLIER 11-12 SEPTEMBRE 1997

CARTOGRAPHIE FINE DU GENE DE RESISTANCE A LA ROUILLE (PUCCINIA MELANOCEPHALA) CHEZ LA CANNE A SUCRE

A. D'HONT et al

INTRODUCTION

La canne à sucre est une monocotylédone de la famille des graminées et du genre *Saccharum*. Elle est taxonomiquement proche du sorgho et du maïs et dans une moindre mesure du riz. Les cultivars sont des hybrides interspécifiques, polyploïdes, aneuploïdes et à base génétique étroite. Une carte génétique a été construite à partir du cultivar R570 (Grivet et al. 1996). R570 a été développée par le CERF à la Réunion. Elle occupe des surfaces importantes à Maurice et à la Réunion et est utilisée comme géniteur dans de nombreux programmes d'amélioration génétique.

Un gène majeur de résistance à la rouille (*Puccinia melanocephala*) a été identifié sur la descendance utilisée pour construire la carte de R570 (Daugrois et al 1996). La ségrégation 3 (résistants) : 1 (sensible) de ce caractère indique la présence d'un gène de résistance dominant. A long terme, ce gène devrait être cloné par clonage positionnel et pourrait ainsi être utilisé pour la transformation des cultivars sensibles.

Le clonage positionnel implique le développement de deux outils :

- une banque de grands fragments (BAC ou YAC) pour isoler le gène. Une banque BAC a ainsi été construite chez la canne à sucre à partir du clone R570 (Wing)
- une carte génétique à haute résolution et haute densité au voisinage du gène ciblé pour initier la marche chromosomique.

Deux approches sont utilisées pour le marquage fin du gène majeur de résistance à la rouille :

- utilisation de la syntenie de la canne à sucre avec le sorgho, le maïs et le riz pour sélectionner des sondes hétérologues susceptibles de se cartographier au voisinage du gène de résistance.
- utilisation de la "Bulk Segregant Analysis" ou BSA avec des marqueurs AFLP

UTILISATION DE LA SYNTHENIE AVEC D'AUTRES GRAMINES

Cette stratégie repose sur l'existence d'une colinéarité entre le genome des graminées (Moore 1995, Moore *et al.* 1995, Paterson *et al.* 1995, Grivet *et al.* 1994, Dufour *et al.* 1996), en particulier ceux de la canne à sucre, du sorgho, du maïs et du riz. Les cartes génétiques de ces 3 dernières espèces sont denses en particulier celle du maïs (Beavis *et al.* 1991, Ahn *et al.* 1993) et celle du riz (Mc Couch *et al.* 1988, Kurata *et al.* 1994, Causse *et al.* 1994).

La carte génétique RFLP de R570 (Grivet *et al.* 1996) n'est pas saturée mais il apparaît que le gène de résistance est lié à un marqueur révélé par la sonde CDSR29 (distance marqueur-gène : 10 cM). Le locus révélé par cette sonde a été cartographié chez le Sorgho (Dufour *et al.* 1997).

En prenant comme point de départ le locus révélé par la sonde CDSR29 chez le sorgho il a été possible d'identifier les régions homologues sur le génome du maïs en observant la position de carte des marqueurs adjacents cartographiés chez les deux espèces, sorgho et maïs (la sonde CDSR29 n'hybride pas sur le maïs). Puis en progressant de proche en proche la région homologue du génome du riz a également été identifiée. Toutes les sondes révélant un locus dans l'un de ces segments chromosomique homologue du sorgho, du maïs ou du riz, sont des marqueurs potentiels du gène de résistance à la rouille chez la canne. Ceci à la condition que la colinéarité des génomes soit effectivement respectée sur toute la longueur du segment et que la

sequence de ces sondes soit restée suffisamment proche de leur version orthologue chez la canne de façon à ce qu'un signal soit détectable par hybridation Southern.

Un travail préliminaire a été effectué afin de démontrer la faisabilité de l'approche. Trente quatre sondes potentiellement intéressantes ont été identifiées en suivant la démarche énoncée ci-dessus. Parmi ces trente quatre sondes, quatorze ont donné un signal suffisamment intense pour pouvoir être utilisé en hybridation Southern. Parmi ces dernières, 4 se sont cartographiées au voisinage du gène de résistance à la rouille chez la canne (fig. 1).

Dans un deuxième temps, un travail en cours, plus détaillé, a permis la sélection de 240 nouvelles sondes hétérologues par comparaison de carte avec le sorgho, le maïs et le riz (dont 103 sondes de riz, 89 de maïs, 25 de sorgho, 24 d'avoine et 4 d'orge; les sondes d'avoine et d'orge avaient été cartographiées chez le riz). Parmi ces sondes, 75 donnent un signal exploitable chez la canne à sucre. Ces sondes seront prochainement cartographiées.

A l'issue de cette étape de repérage des marqueurs lié au gène par cartographie sur une descendance de 90 individus, les marqueurs les plus proches du gène seront analysés sur une population de grande taille de façon à construire une carte génétique à haute résolution.

BSA ET MARQUEURS AFLP

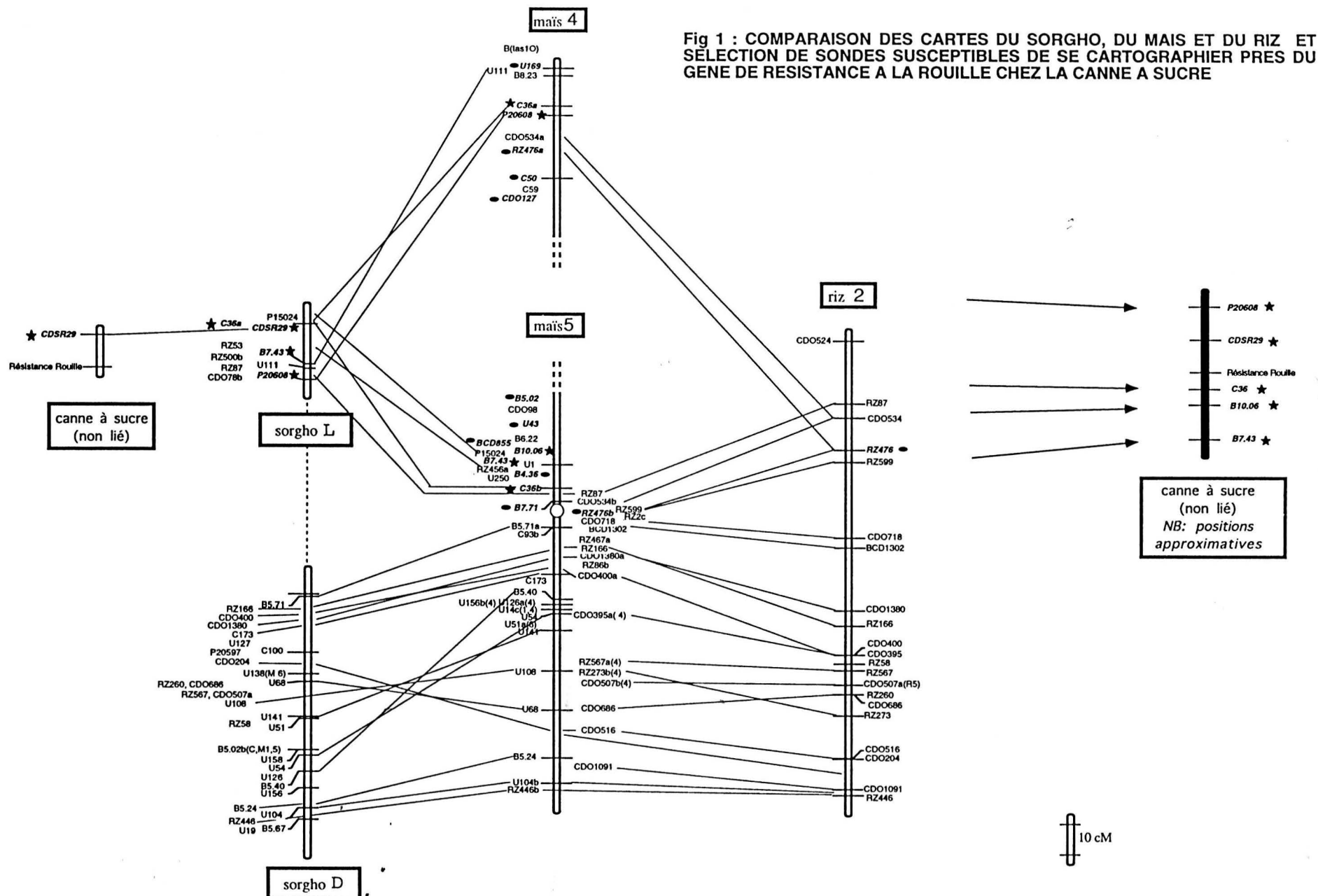
La BSA (Michelmore *et al.* 1991) ou analyse de ségrégation en mélange est une méthode qui permet de repérer rapidement des marqueurs liés à un gène majeur sans avoir à construire de carte génétique. Dans une descendance où ségrége le gène à étudier, on regroupe l'ADN de plusieurs individus (5 à 20) qui ont le même génotype au locus étudié (dans le cas présent il s'agit d'un groupe d'individus sensibles et d'un groupe d'individus résistants). Les marqueurs proche du gène sont présents dans un groupe (ou pool) et absent dans l'autre, par contre, les marqueurs non liés au gène sont monomorphes entre les deux pools (fig. 2). Ensuite seuls les marqueurs identifiés comme liés au gène de résistance sont cartographiés sur la population de travail.

La technique de marquage utilisés pour cette approche est l'AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) (Zabeau et Vos 1992) car elle permet de générer un grand nombre de marqueurs en peu de temps.

Une analyse préliminaire portant sur 64 couples d'amorces (combinaisons de 8 amorces EcoRI et 8 amorces MseI) a permis de révéler 4 marqueurs liés au gène étudié. Un de ceci a été cartographié sur la population de référence et il se positionne à 3.8 cM du gène de résistance à la rouille. D'autres couples d'amorces seront étudiés prochainement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahn S. and Tanksley S.D., 1993. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 7980-7984
- Beavis W.D. and Grant D., 1991. A linkage map based on information from four F2 populations of maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 82 : 636-644
- Causse M.A., Fulton T.M., Cho Y.G., Ahn S.N., Chunwongse J., Wu K., Xiao J., Yu Z., Ronald P.C., Harrington S.E., Second G., McCouch S.R. and Tanksley S.D., 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on a interspecific backcross population. *Genetics* 138 : 1251-1274
- Daugrès J.H., Grivet L., Roques D., Hoarau J.Y., Lombard H., Glaszmann et D'Hont A., 1996. A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570'. *Theor. Appl. Genet.* 92 : 1059-1064
- Dufour P., Grivet L., D'Hont A., Deu M., Trouche G., Glaszmann J.C. and Hamon P., 1996. Comparative genetic mapping between duplicated segments on maize chromosomes 3 and 8 and homeologous regions in sorghum and sugarcane. *Theor. Appl. Genet.* 92 : 1024-1030
- Dufour P., Deu M., Grivet L., D'Hont A., Paulet F., Bouet A., Lanaud C., Glaszmann J.C. and Hamon P., 1997. Construction of a composite map and comparison with sugarcane, a related complex polyploid. *Theor. Appl. Genet.* 94 (3-4) : 409-418
- Grivet L., D'Hont A., Dufour P., Hamon P., Roques D. and Glaszmann J.C., 1994. Comparative genome mapping of sugar cane with other species within the Andropogoneae tribe. *Heredity* 73 : 500-508
- Grivet L., D'Hont A., Dufour P., Feldmann P., Lanaud C. and Glaszmann J.C., 1996. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp) : genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics* 142 : 987-1000
- Kurata N., Moore G., Nagamura Y., Foote T., Yano M., Minobe Y. and Gale M., 1994. Conservation of genome structure between rice and wheat. *Bio/Techno.* 12 : 276-278
- McCouch S.R., Kochert G., Yu Z.H., Wang Z.Y., Klush G.S., Coffman W.R. and Tanksley S.D., 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76 : 815-829
- Michelmore R.W., Paran I. and Kesseli R.V., 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulk segregant analysis : a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 9828-9832
- Moore G., Devos K.M., Wang Z. and Gale M.D., 1995. Grasses, line up and form a circle. *Current Biology* 5 (7) : 737-739
- Moore G., 1995. Cereal genome evolution : pastoral pursuits with 'lego' genomes. *Current biology* 5 : 717-724
- Paterson A.H., Lin Y.R., Li Z., Schertz K.F., Doebley J.F., Pinson S.R., Liu S.C., Stansel J.W. and Irvine J.E., 1995. Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding loci. *Science* 69 : 1714-1718
- Zabeau M. and Vos P., 1992. Selective restriction fragment amplification : a general method for DNA fingerprinting. European patent application, publication n°EP0534858



● marqueurs sélectionnés chez le maïs, le riz et le sorgho susceptibles de se cartographier au voisinage du gène de résistance à la rouille
 ★ marqueurs cartographiés près du gène de résistance à la rouille chez la canne à sucre
 abréviations des noms de sondes : B=BNL, C=CSU, U=UMC et P=PHP

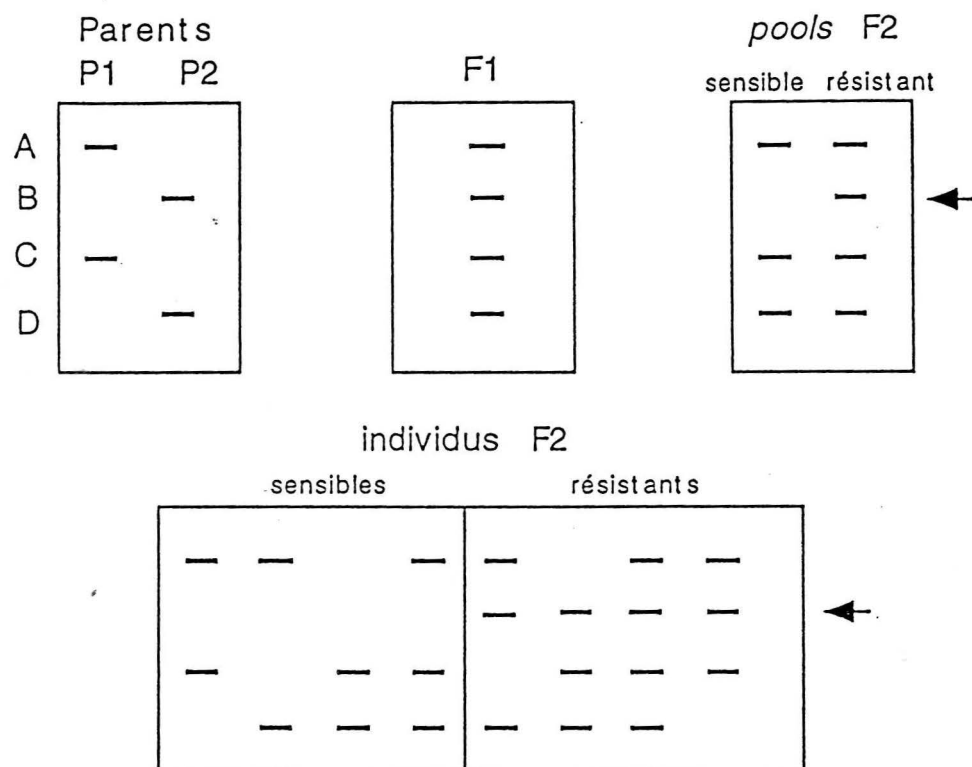


Figure 2 (Michelmore *et al.*, 1991) : Bulk Segregant Analysis.

Génotype des parents, de leurs descendants F1 et F2 et de deux pools constitués d'individus F2 sensibles et résistants pour 4 locus AFLP. L'allèle dominant au locus B est lié au gène étudié : il est polymorphe entre les deux pools. Les 3 autres loci étaient polymorphes chez les parents mais non liés au gène étudié, ils apparaissent monomorphes entre les deux pools.